

3. Shear stress abnormalities contribute to endothelial dysfunction in hypertension but not in type II diabetes / Y. Kuder [et al.] // J. Hypertension. – 1998. – Vol. 16, № 11. – P. 1619–1625.

4. Endogenous and exogenous nitric oxide inhibits norepinephrine release from rat heart sympathetic nerves / P. Schwarz [et al.] // Circulat. Res. – 1995. – № 77. – P. 841–848.

5. Antoniucci, D. L. The vascular tree as an endocrine organ: Paracrine and autocrine effects of endothelin / D. L. Antoniucci, L. A. Fitzpatrick // Endocrinologist. L. – 1996. – № 6. – P. 481–487.

6. Лазуко, С. С. Роль индуцированной NO-синтазы в эндотелийзависимой регуляции тонуса артериальных сосудов при адаптации короткими стрессорными воздействиями / С. С. Лазуко, А. П. Солодков, К. А. Шилин // Вестник ВГМУ. – 2013. – Т. 12, № 4. – С. 44–49.

7. Мареев, В. Ю. Четверть века эры ингибиторов АПФ в кардиологии / В. Ю. Мареев // Русский медицинский журнал. – 2000. – № 8. – С. 15–16.

8. Сиренко, Ю. Н. Эналаприл в кардиологии и терапии: стандарт эффективности и безопасности среди ингибиторов АПФ //

Новости медицины и фармации. – 2011. – № 13. – С. 376–377.

9. Clozel, M. Mechanism of action of angiotensin converting enzyme inhibitors on endothelial function in hypertension / M. Clozel // J. Hypertension. – 1991. – Vol. 10, № 18. – P. 37–42.

10. Creager, M. A. Effects of captopril and enalapril on endothelial function in hypertensive patients / M. A. Creager, M. A. Roddy // Hypertension. – 1994. – Vol. 24, № 24. – P. 499–505.

11. Мишаткина, Т. В. Биомедицинская этика в документах / Т. В. Мишаткина. – Минск: Междунар. госуд. эколог. ун-т им. А. Д. Сахарова, 2008. – 34 с.

#### Адрес для корреспонденции:

210023, Республика Беларусь,  
г. Витебск, пр. Фрунзе, 27,  
УО «Витебский государственный  
ордена Дружбы народов  
медицинский университет»,  
кафедра нормальной физиологии,  
тел. раб.: 8(0212) 37-07-54;  
e-mail: maiorova\_ss@mail.ru,  
Скринаус С. С.

Поступила 13.11.2014 г.

Н. В. Давишня, И. А. Зупанец, С. К. Шебеко

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ КОМБИНАЦИИ ГЛЮКОЗАМИНА С КЕТОПРОФЕНОМ В ФОРМЕ КРЕМ-ГЕЛЯ НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ СУСТАВНОГО ХРЯЩА

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков, Украина

*В статье представлены результаты изучения хондропротекторных свойств крем-геля глюкозамина с кетопрофеном в условиях моделирования системного стероидного артроза у крыс на основании состояния ультраструктуры хрящевой ткани. В качестве лекарственных средств (ЛС) сравнения были использованы глюкозамин в форме крем-геля и «Фастум гель». Под влиянием изучаемой комбинации зафиксировано усиление биосинтетических процессов в хондроцитах и нормализация структуры хрящевого матрикса.*

**Ключевые слова:** глюкозамин, кетопрофен, крем-гель, остеоартроз.

#### ВВЕДЕНИЕ

Остеоартроз (ОА) – хроническое дегенеративно-дистрофическое заболевание суставов, характеризующееся прогрессирующей деструкцией суставного хряща, пролиферативной реакцией хрящевой и костной

тканей и сопровождающееся реактивным синовитом [1]. Распространенность остеоартроза в возрасте после 55 лет находится в диапазоне от 30% до 50% у мужчин и от 40% до 60% у женщин [2]. Остеоартрозом страдают около 90% населения в возрасте старше 65 лет [3], при этом более полови-

ны из них имеют те или иные ограничения в движении, а 25% не могут справиться с основными ежедневными жизненными потребностями. Подсчитано, что через 15 лет ОА будет четвертой по значимости причиной инвалидности в США. Прогрессирование заболевания, сопровождающееся постоянными болями в пораженных суставах, является причиной нетрудоспособности таких пациентов, оказывая тем самым тяжелое экономическое и психологическое воздействие не только на пациента, но и на его близких.

Целью данного исследования явилось изучение хондропротекторных свойств нового комбинированного препарата глюкозамина с кетопрофеном в форме крем-геля (Г/К крем-гель) для наружного применения. Комбинация содержит компоненты, способные влиять на два основных звена патогенеза ОА: дегенеративно-дистрофическое и воспалительно-деструктивное.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Изучение хондропротекторных свойств исследуемого средства проведено на модели системного стероидного артроза (ССА) у крыс [1]. Объектом исследования стало оригинальное средство – комбинация глюкозамина с кетопрофеном в форме крем-геля (Г/К крем-гель) для наружного применения, с соотношением 2,5:1. В качестве ЛС сравнения были взяты глюкозамин в форме крем-геля (ГА крем-гель) и «Фастум гель». Исследование проведено на 60 белых нелинейных крысах-самцах, которые в свою очередь разделялись на 5 опытных групп: 1-я группа – интактный контроль ( $n = 10$ ); 2-я группа – контрольная патология ( $n = 20$ ); 3-я группа – крысы с артрозом, получающие Г/К крем-гель в условно-терапевтической дозе 50 мг ( $n = 10$ ); 4-я группа – крысы с артрозом, получающие ГА крем-гель в эквивалентной дозе 50 мг ( $n = 10$ ); 5-я группа – крысы с артрозом, получающие препарат «Фастум гель» в эквивалентной дозе 50 мг ( $n = 10$ ). У всех крыс проводили моделирование ССА путем трехкратного внутримышечного введения в мышцу бедра дексаметазона в разовой дозе 7 мг/кг с интервалом в 1 неделю согласно методическим рекомендациям [1, 4, 5]. Начиная с 28 дня эксперимента и на протяжении 4 недель, все животные ежедневно получали соответ-

ствующие средства, которые наносились наружно путем кожных аппликаций в области коленных суставов на обеих лапах в эквивалентных количествах – по 50 мг на каждую. После завершения нанесения исследуемых средств (на 56 сутки эксперимента) все животные подвергались декапитации под эфирным наркозом. Исследование ультраструктуры суставного хряща крыс проводили с помощью стандартных методов электронной микроскопии [6, 7]. Для предварительного обнаружения необходимого участка ткани для изучения в электронном микроскопе изготавливали полутонкие срезы, которые окрашивали 1,0% раствором метиленового синего и изучали под световым микроскопом МИКМЕД-1 (ПО «ЛОМО», Россия). Ультратонкие срезы для электронной микроскопии контрастировали по Рейнольдсу, монтировали на электролитические сеточки и изучали в электронном микроскопе ЕМ-125 (Сумское ПО «Электрон», Украина) при увеличении 8 000–12 000 крат, соответствующем целям исследования. Для фотографирования микропрепаратов использовали высококонтрастную фототехническую пленку Масо EMFilms (Германия).

### **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

В ходе электронно-микроскопического исследования микропрепаратов суставного хряща интактных животных была обнаружена ультраструктурная организация, соответствующая современным представлениям о строении хряща [8, 9] (рисунки 1, 2).

В образцах наблюдались хрящевые клетки – хондроциты, которые в зависимости от степени зрелости и дифференцировки отличались формой, размером и уровнем метаболической активности. Они располагались в хрящевой матриксе, формируя в нем лакуны, которые полностью заполняли.

В большинстве клеток содержалось ядро неправильной овальной формы с темной каймой гетерохроматина (конденсированный хроматин), а также с электронноплотными конъюгатами гетерохроматина, расположенными в центральной зоне в виде хлопьевидных включений и большим содержанием эухроматина (диспергированный хроматин), что указывает на высокий биосинтетический потенциал данных клеток (рисунки 1, 2). Цитоплазма хондроцитов содержала стандартный

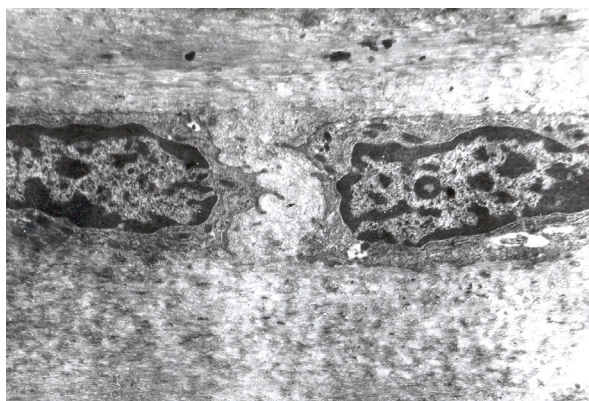


Рисунок 1 – Ультраструктура суставного хряща интактных крыс. Поверхностная зона. Типичные хондроциты. Ядро вытянутой формы с темной каймой гетерохроматина вдоль нуклеолеммы. В цитоплазме много рибосом, короткие профили гранулярной эндоплазматической сети, везикулы, секреторные пузырьки. Увеличение 8 000

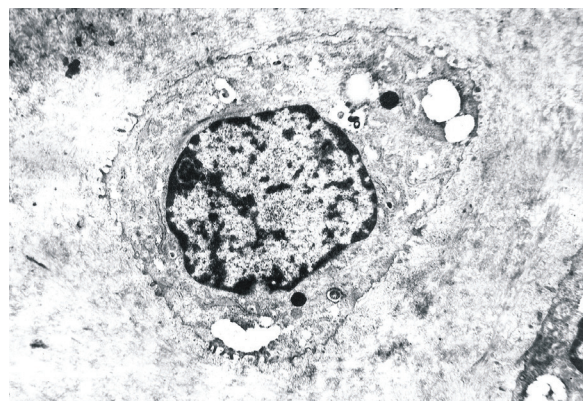


Рисунок 2 – Средняя зона. Типичный хондроцит. Ядро округлой формы с темной плоской гетерохроматиной. Наличие выростов и микроворсинок на поверхности. В цитоплазме расширенные профили гранулярной эндоплазматической сети с белковым содержанием, много рибосом, везикул, секреторных пузырьков. Увеличение 12 000

набор органелл, синтезирующих волокнистое и аморфное межклеточное вещество. Среди структурных компонентов цитоплазмы наиболее хорошо развита гранулярная эндоплазматическая сеть (ЭПС) в виде длинных профилей, ответственная за синтез экспортных белковых соединений. В непосредственной близости от ядра располагается аппарат Гольджи и секреторные пузырьки. Также в цитоплазме содержатся митохондрии, но в незначительном количестве. Поверхность хряща ровная, образованная электронноплотным слоем бесклеточной пластинки с высоким содержанием пучков коллагеновых волокон, имеющих четкую упорядоченность структуры параллельно поверхности.

При исследовании ультраструктуры суставного хряща крыс группы контрольной патологии в микропрепаратах наблюдались выраженные дегенеративно-дистрофические изменения суставной ткани, соответствующие современным представлениям об ультраструктурных особенностях формирования ОА [10–12]. В большинстве микропрепаратов в поверхностном слое хряща идентифицировались молодые деформированные хондроциты с темной цитоплазмой неравномерной электронной плотности, содержащей большое количество вакуолей, коротких профилей гладкой ЭПС, капель липидов, скоплений гликогеновых гранул и много различных электронноплотных включений (рисунок 3).

Все это в целом свидетельствует о выраженных нарушениях биосинтетических процессов. В промежуточной зоне суставного хряща наиболее выраженные изменения наблюдались в хрящевом матриксе. Так, электронная плотность по сравнению с интактным хрящом в целом была значительно снижена, с большим количеством неравномерно окрашенных зон. Структура коллагеновых волокон на многочисленных участках нарушена, с выраженными признаками деструкции (рисунок 4). Кроме того, в матриксе отмечалось наличие темных включений разной электронной плотности (рисунок 4).

Следует отметить, что в большинстве данных клеток присутствовали в подавляющем количестве крупные и мелкие лизосомы, содержащие лизосомальные ферменты (преимущественно металлопротеазы), которые, в свою очередь, имеют важнейшее значение в патогенезе ОА, поскольку являются фактором деструкции хрящевой ткани (рисунок 4). В большинстве микропрепаратов хрящевой ткани данной группы в средней и глубокой зоне хряща наблюдались хондроциты на разных стадиях, так называемой «темноклеточной» гибели, выделяемой некоторыми авторами в качестве отдельного вида клеточной смерти [11, 12]. Данные научной литературы свидетельствуют, что описанные «темные» клетки подвергаются процессам апоптоза [13–15].



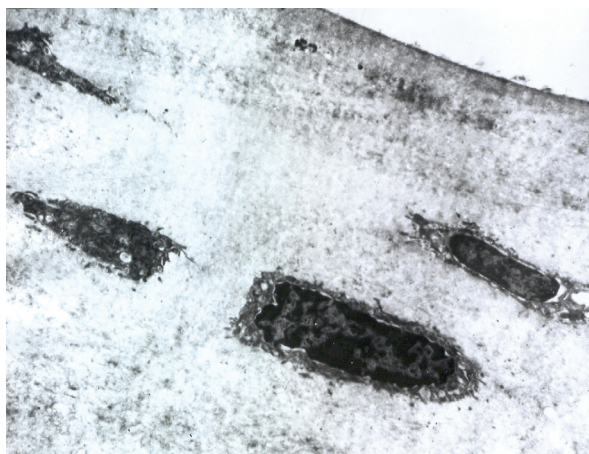


Рисунок 3 – Ультраструктура суставного хряща крыс с артрозом. Хондроциты поверхностной зоны. В цитоплазме много коротких профилей эндоплазматической сети, липидных включений, скоплений гликогена. Увеличение 8 000

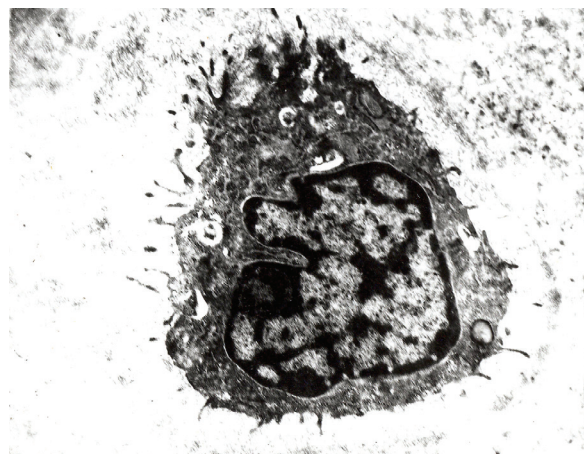


Рисунок 4 – Ультраструктура суставного хряща крыс с артрозом. Дистрофически измененный хондроцит промежуточной зоны. В цитоплазме включения липидов, много лизосом, короткие профили гранулярной эндоплазматической сети, скопления гликогена. Деструкция хрящевого матрикса. Увеличение 12 000

Результаты исследования ультраструктуры суставного хряща крыс под воздействием препарата Г/К крем-гель свидетельствуют о значительном усилении метаболической активности хрящевых клеток и уменьшении проявлений дегенеративно-дистрофических процессов по сравнению с группой контрольной патологии.

При изучении поверхностной зоны хряща в нем обнаруживался матрикс с равномерной электронной плотностью и высокоупорядоченной волокнистой структурой, в котором расположены молодые хондроциты продолговатой формы. Большинство клеток имели ядро неправильной вытянутой формы с высоким содержанием эухроматина, а также узкую цитоплазму с органеллами, среди которых преимущественно определялись короткие профили гранулярной ЭПС и вакуолизированные пластинчатые комплексы Гольджи (рисунок 5). В промежуточной зоне хряща также наблюдалась хорошая сохранность матрикса, высокая и равномерная электронная плотность которого говорит о наличии фибрилл коллагена и протеогликанов с хорошо упорядоченной структурой (рисунок 6).

Основной особенностью большинства хрящевых клеток в данной группе являлось наличие в цитоплазме ярко выраженных мембранных структур гранулярной ЭПС, формирующих длинные профили,

усаженных рибосомами, а также вакуолизированных пластинчатых комплексов Гольджи (рисунок 6).

В клеточных ядрах было замечено низкое содержание конденсированного хроматина и высокое – диспергированного. Данная ультраструктурная картина свидетельствует о высокой биосинтетической активности хрящевых клеток и практически полном отсутствии влияния на них дегенеративно-дистрофических процессов. В некоторых микропрепаратах в промежуточной зоне хряща выявлялись крупные хондроциты с гиперплазированной цитоплазмой, содержащей ярко выраженные длинные профили гранулярной ЭПС.

Структурные особенности данных клеток также свидетельствуют о высокой биосинтетической активности. В отличие от группы контрольной патологии в ультраструктуре хряща животных, получавших Г/К крем-гель, не наблюдались «темные» клетки, а также хондроциты с признаками классического апоптоза.

При электронно-микроскопическом исследовании структуры суставного хряща животных с экспериментальным артрозом под воздействием лекарственного средства сравнения ГА крем-гель обнаруживалась ультраструктурная картина, подобная вышеописанной, но с наличием незначительных проявлений дегенеративно-дистро-



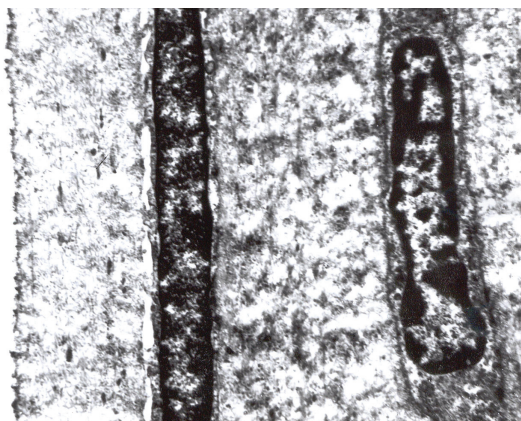


Рисунок 5 – Ультраструктура суставного хряща крыс с артрозом под воздействием ЛС Г/К крем-гель. Хондроциты поверхностной зоны. В цитоплазме короткие профили гранулярной эндоплазматической сети, лизосомы, включения липидов. Высокоупорядоченная волокнистая структура хрящевого матрикса. Увеличение 12 000

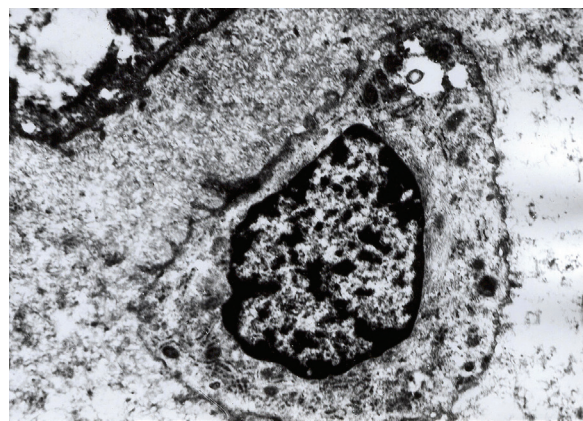


Рисунок 6 – Ультраструктура суставного хряща крыс с артрозом под воздействием ЛС Г/К крем-гель. Типичный хондроцит промежуточной зоны. Цитоплазматические выросты на поверхности клетки. В цитоплазме ярко выраженные короткие профили гранулярной эндоплазматической сети, много свободных рибосом, секреторных пузырьков. Структура матрикса сохранена. Увеличение 12 000

фического поражения хрящевой ткани. В большинстве микропрепаратов наблюдался хрящевой матрикс с высокой электронной плотностью, равномерно окрашенный, что говорит о содержании большого количества коллагеновых волокон и хорошей упо-

рядоченности их структуры (рисунок 7).

В промежуточной и радиальной зонах хряща были найдены хондроциты с хорошо развитыми цитоплазматическими ножками и гиперплазированной цитоплазмой (рисунки 7, 8).



Рисунок 7 – Ультраструктура суставного хряща крыс с артрозом под воздействием ЛС ГА крем-гель. Типичные хондроциты промежуточной зоны. Высокая гетерохроматизация клеточного ядра. В цитоплазме много коротких профилей гранулярной эндоплазматической сети, тонких волокон, секреторных пузырьков, вакуолей. Высокая электронная плотность хрящевого матрикса. Увеличение 8 000

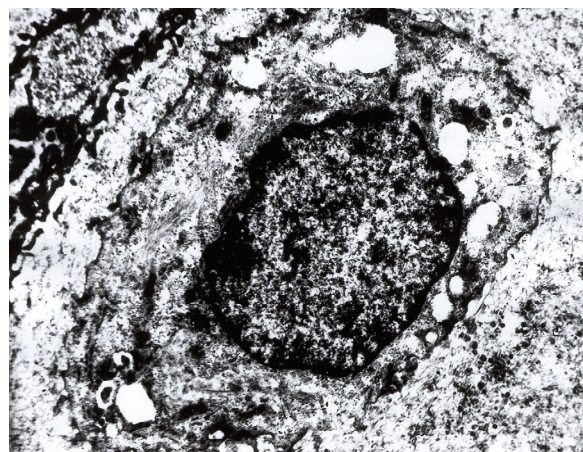


Рисунок 8 – Ультраструктура суставного хряща крыс с артрозом под воздействием ЛС ГА крем-гель. Типичный хондроцит радиальной зоны. В цитоплазме много осмиофильных волокон и вакуолей. Упорядоченная структура хрящевого матрикса. Увеличение 12 000



Но в некоторых микропрепаратах наблюдались хондроциты с повышенной гетерохроматизацией клеточного ядра, что говорит о снижении интенсивности биосинтетических процессов (рисунки 7, 8).

В цитоплазме данных клеток обнаруживались темные осmioфильные волокна, много вакуолей, прочих электронноплотных включений, а также расширенные и короткие профили гранулярной ЭПС. Также как и в предыдущей экспериментальной группе практически не обнаруживались хондроциты с признаками классического апоптоза.

В ходе изучения влияния ЛС сравнения «Фастум гель» на ультраструктуру хряща крыс с ССА проявилась картина ультраструктуры, подобной группе контрольной патологии, с наличием меньшей степени дегенеративно-дистрофического поражения хрящевой ткани. В промежу-

точной и радиальной зонах хряща обнаруживались хондроциты с выраженными дистрофическими признаками. В данных клетках наблюдалась деформация клеточного ядра, пониженное содержание в нем эухроматина (рисунок 9).

В цитоплазме практически отсутствовали мембранные структуры ЭПС и комплексы Гольджи, что говорит о низкой биосинтетической активности хондроцитов. Также в цитоплазме выявлены крупные вакуоли, включения липидов, скопления гликогеновых гранул, что является признаками нарушения метаболических процессов (рисунок 9). Структура коллагеновых волокон на большинстве участков была нарушена, с выраженными признаками деструкции (рисунки 9, 10). При этом встречались хондроциты по морфологическим признакам, находящиеся в состоянии «темноклеточной» гибели (рисунки 9, 10).

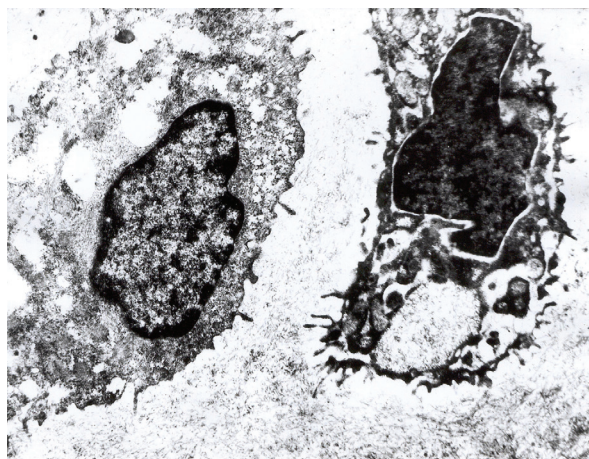


Рисунок 9 – Ультраструктура суставного хряща крыс с артрозом под воздействием ЛС «Фастум гель». Дистрофически измененные хондроциты промежуточной зоны. Хондроцит с деформированным уплотненным ядром и темной вакуолизированной цитоплазмой. Снижение электронной плотности хрящевого матрикса. Увеличение 12 000

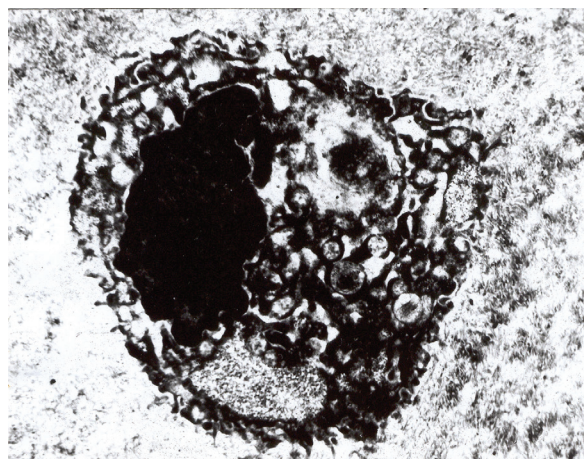


Рисунок 10 – Ультраструктура суставного хряща крыс с артрозом под воздействием ЛС «Фастум гель». Хондроцит с признаками «темноклеточной» гибели. Гетерохроматизация клеточного ядра, уплотнение мембранных структур, гипервакуолизированная цитоплазма. Нарушение структуры хрящевого матрикса. Увеличение 12 000

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты исследования ультраструктуры хрящевой ткани крыс с экспериментальным артрозом под влиянием ЛС Г/К крем-гель показали усиление биосинтетических процессов в хондроцитах и нормализацию структуры хрящевого матрикса.

При этом исследуемое ЛС по степени позитивного воздействия на ультра-

структуру хрящевой ткани незначительно превышает активность ЛС сравнения ГА крем-гель и выраженно превосходит уровень активности ЛС «Фастум гель».

Полученные результаты позволяют сделать заключение о том, что ЛС Г/К крем-гель обладает хондропротекторной активностью, и его дальнейшее экспериментальное изучение является обоснованным и необходимым.

**SUMMARY**

N. V. Davishnia, I. A. Zupanets,  
S. K. Shebeko

**EXPERIMENTAL STUDY OF  
COMBINATION INFLUENCE OF  
GLUCOSAMINE WITH  
KETOPROFEN IN THE FORM OF  
CREAM-GEL TO ARTICULAR  
CARTILAGE  
ULTRASTRUCTURE**

The article presents the results of a study of chondroprotective properties of combination glucosamine with ketoprofen cream-gel in a modeling systemic steroid osteoarthritis in rats, based on the condition of the ultrastructure of cartilage. As reference drugs glucosamine cream-gel and "Fastum gel" were used. Under the influence of the studied combination enhancement of biosynthetic processes in chondrocytes and the normalization of the structure of cartilage matrix were fixed.

Keywords: glucosamine, ketoprofen, cream-gel, osteoarthritis.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Цурко, В. В. Остеоартроз / В. В. Цурко, Н. А. Хитров // Терапевтический архив. – 2000. – Т. 72, № 5. – С. 62–66.
2. Recommendations for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee: update. American College of Rheumatology Subcommittee on Osteoarthritis Guidelines. // *Arthritis Rheum.* – 2000 – 43:1. – P. 1905–1915.
3. Голубев, Г. Ш. Оценка доказательств эффективности средств, претендующих называться “структурно-модифицирующими препаратами” / Г. Ш. Голубев, О. С. Кригштейн // *Международный журнал медицинской практики.* – 2005. – № 2. – P. 38–52.
4. Дослідження впливу кверцетину на апоптоз хондроцитів в умовах розвитку експериментального остеоартрозу / В. Ф. Усенко [та інш.] // *Український ревматологічний журнал.* – 2011. – № 3 (45). – С. 62–66.
5. Зупанець, К. О Дослідження впливу композиції на основі кверцетину та похідних глюкозаміну на процеси апоптозу хондроцитів в умовах розвитку експериментального остеоартрити / К. О. Зупанець, С. К. Шебеко, І. А. Отрішко // *Ліки України плюс.* – 2010 – № 3 (12). – С. 47–50.

6. Кузнецов, С. Л. Гистология, цитология и эмбриология: Учебник для медицинских вузов. / С.Л. Кузнецов, Н.Н. Мушкабаров // – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2007. – 600 с.

7. Уикли, Б. Электронная микроскопия для начинающих / Б. Уикли // Пер. с англ. – М.: Мир, 1980. – 220 с.

8. Юшканцева, С. И. Гистология, цитология и эмбриология / С. И. Юшканцева, В. Л. Быков // Краткий атлас: Учебное пособие. – 2-е изд., перераб. и доп. – СПб.: Изд-во «П-2», 2007. – 120 с.

9. Афанасьев, Ю. И. Гистология, цитология и эмбриология / Ю. И. Афанасьев, Н. А. Юрина. – 5-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2002. – 744 с.

10. Ультраструктурные особенности хондроцитов суставного хряща в зависимости от стадии гонартрита, / Ю. И. Бородин [и др.] // *Бюллетень СО РАМН.* – 2008. – №6 (134). – С. 187–190.

11. Корж, Н. А. Остеоартроз: консервативная терапия / Н. А. Корж, Н. В. Дедух, И. А. Зупанец // Харьков: Золотые страницы, 2007. – 424 с.

12. Modifications of Golgi Complex in Chondrocytes from Osteoarthrotic (OA) Rat Cartilage / J. B. Kouri [et al.] // *J. Histochem. Cytochem.* – 2002. – Vol. 50(10). – P. 1333–1339.

13. Rode Ed. H. J. Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation / Ed. H. J. Rode // 4-th edition. – Mannheim: Roche Diagnostics GmbH, 2008. – 180 p.

14. Матвеева, Н. Ю. Апоптоз: морфологические особенности и молекулярные механизмы / Н.Ю. Матвеева // *Pacific Medical Journal.* – 2003. – № 4. – С. 12–16.

15. Chondroptosis: an immunohistochemical study of apoptosis and Golgi complex in chondrocytes from human osteoarthritic cartilage / E. H. Perez [et al.] // *Apoptosis.* – 2005. – Vol. 10. – P. 1105–1110.

**Адрес для корреспонденции:**

61057, Украина,  
г. Харьков, ул. Пушкинская, 27,  
Национальный фармацевтический университет,  
кафедра клинической фармакологии и  
клинической фармации,  
тел. +380577063072,  
Давишня Н. В.

Поступила 13.11.2014 г.